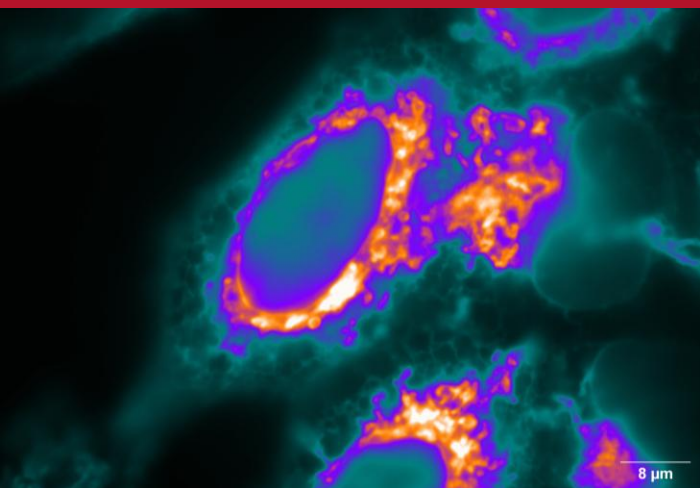


Industrielle Gemeinschaftsforschung

F.O.M.

039



Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Nanoskopie mit wiederholbaren Speckle-Mustern zur 3D-Rekonstruktion (NanoSpeck3D)

Die Herausforderung

Bei der hochauflösenden 3D-Mikroskopie bewirken die begrenzte laterale und axiale Auflösung herkömmlicher Methoden Limitationen. Bestehende Verfahren wie die Einzelmolekül-Lokalisierungs-Mikroskopie, Mikroskopie mit stimulierter Emissionsverarmung (STED), oder Minimal-Photonenfluss-Lokalisations-Mikroskopie (MINIFLUX) sind aufwändig und erfordern spezielle Probenpräparationen. Die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) bedarf einer weniger aufwändigen Probenpräparation, ist jedoch technisch hinsichtlich ihrer zeitlich-räumlichen Auflösung begrenzt. Eine schnelle, nanometergenaue 3D-Darstellung lebender Zellen oder größerer Organismen ist derzeit mit keiner fluoreszenzbasierten hochauflösenden Mikroskopiertechnik möglich. Für biomedizinische und industrielle Anwendungen wird eine kostengünstige, einfach integrierbare Lösung für supraauflösende 3D-Rekonstruktionen benötigt. Die Herausforderung besteht in der Tiefenunschärfe, da es in biologischen Proben oft mehrere Sichtstrahlen gibt, was zu Mehrdeutigkeiten in der Tiefeninformation führt.

Die Innovationsidee

Ziel des IGF-Projekts war die Entwicklung eines kostengünstigen Mikroskopiemoduls für eine Intravitalmikroskopie mit < 50 nm lateraler, < 100 nm axialer und mit einer zeitlichen Auflösung von 1 s in einem ausgedehnten Volumen, ohne notwendige chemisch-toxische Probenvorbereitungen. Dies soll durch eine Kombination von strukturierter Beleuchtung der Probe mit mehreren wiederholbaren überlagerten und ansteuerbaren statistischen Mustern (Speckles) verschiedener Wellenlänge mit der dadurch angeregten nicht-linearen Antwort der Fluorophore sowie einem optimierten Kalibrierverfahren erzielt werden. Mit dem Mikroskopiemodul sollten hohe Projektionsraten und Rekonstruktionsraten von über 1 Hz erreicht werden. Weiterhin sollte ein alternativer 3D-Charakterisierungsansatz untersucht werden, bei dem eine Event-basierte Detektion und ein optisches Schnittverfahren führen könnten. Das zu entwickelnde Modul sollte in bestehende Mikroskopieplattformen integrierbar sein, um eine einfache Anwendung in der Biomedizin und Industrie zu ermöglichen.

Projektinformationen

IGF-Nr.:	01IF22462N
Laufzeit:	07/2022 - 12/2024
Fördersumme:	448.779 EUR
Industrieleistungen:	76.663 EUR

Forschungseinrichtungen

- Universität Jena, Institut für Angewandte Optik und Biophysik (IAOB)
- Universitätsklinikum Jena, Sektion Translationale Neuroimmunologie

Projektbegleitender Ausschuss

- asphericon GmbH ^{KMU}
- ATTO-TEC GmbH ^{KMU}
- Carl Zeiss AG
- Carl Zeiss Microscopy GmbH
- GATTAquant GmbH ^{KMU}
- GRINTECH GmbH ^{KMU}
- HOLOEYE Photonics AG ^{KMU}
- JENOPTIK AG
- Lasertack GmbH ^{KMU}
- LASOS Lasertechnik GmbH ^{KMU}
- LAYERTEC GmbH ^{KMU}
- Optics Balzers Jena GmbH
- piezosystem jena GmbH ^{KMU}
- POG Präzisionsoptik Gera GmbH ^{KMU}

- **Strukt. Beleuchtg. m. überlagerten Speckle-Mustern versch. Wellenl.**
- **Nanometer-genaue 3D-Darstellg. lebender Zellen i. großen Volumen**

Projektbegleitender Ausschuss (Fs.)

- Sartorius Autom. Lab Solutions GmbH
- Wienecke & Sinske GmbH ^{KMU}

Projektbegleitende akademische Abschlussarbeiten

- Eine Dissertation
- Zwei Master-Arbeiten
- Eine Bachelor-Arbeit

Das Programm "Industrielle Gemeinschaftsforschung" (IGF) ...

... fördert Studien zur industriellen Machbarkeit von Innovationsideen und beschleunigt so Technologietrends. Dazu arbeiten Wissenschaft, Industrie und Politik zusammen:

0 Das **BMW** fördert vorwettbewerbliche, innovationsorientierte Forschung mit dem IGF-Programm.

1 **Industrie** und **Wissenschaftler** entwickeln Innovationsideen und geben Projektimpulse.

2 **IGF-Forschungsvereinigungen**, wie die F.O.M., finden Forschungspartner.

3 **Wissenschaftler** von je 1-3 Forschungseinrichtungen schreiben Förderanträge.

4 **Industrieunternehmen** beraten bei der Entwicklung der Anträge.

5 Die **Forschungsvereinigungen** optimieren die Qualität der Vorhaben und der Anträge und reichen die Anträge ein.

6 Ehrenamtliche **Experten aus Industrie und Wissenschaft** begutachten und bewerten die Anträge ganzjährig.

7 Das **BMW** finanziert die Forschungskosten bis max. 275/525/750 T EUR.

8 Die **Industrie** teilt sich die Administrationskosten.

9 Die **Wissenschaftler** der Forschungseinrichtungen führen die Forschung durch.

10 Die **Forschungsvereinigungen** stellen mithilfe von je 10-20 Unternehmen projektbegleitender **Industrierausschüsse** mit mindestens 50 % KMU einen regen Technologietransfer bis in die Branchen hinein sicher.

11 Die **Industrie** sorgt durch Bekundung ihrer Interessen für die Praxisrelevanz der Forschung, steuert Industrieexpertise bei und validiert die Ergebnisse.

Gemeinsam stärken wir die Innovationskraft des Mittelstands und den Fachkräftenachwuchs in Deutschland.

Für eine ausführlichere Fassung des Abschlussberichts wenden Sie sich bitte an:

Kontakt / Impressum

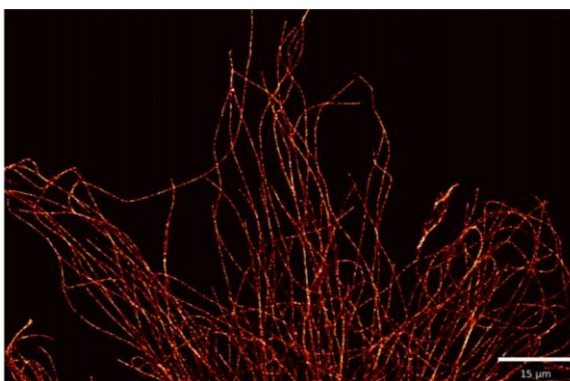
Forschungsvereinigung F.O.M., Berlin
030 4140 21-50, info@forschung-fom.de
www.forschung-fom.de

Die Ergebnisse

Im Projekt konnte ein Mikroskopiemodul mit einer hochfrequenten, Speckle-basierten Beleuchtung realisiert werden und erfolgreich in bestehende kommerzielle Mikroskope integriert werden. Bei der Verwendung monochromatischer Speckle-Muster konnten Projektionsraten von mehreren hundert Hz erreicht werden. Auch konnten eine Rekonstruktionsrate über 25 Hz und eine laterale Auflösung bis ca. 65 nm erreicht werden. Die angestrebte axiale Auflösung von < 100 nm konnte dagegen bei biologischen Proben unter realen Untersuchungsbedingungen mit nur einer Kamera nicht erzielt werden: Entlang des Sichtstrahls trat meist mehr als ein fluoreszenter Objektpunkt auf, sodass keine eindeutige Tiefeninformation aus den Speckle-Mustern gewonnen werden konnte. Es wurde daher ein eventbasiertes Detektionsverfahren mit einer neuromorphen Event-Kamera und einem optischen Schnittverfahren entwickelt, das vielversprechende Ergebnisse zeigt.

Zur raum-zeitlichen Rekonstruktion wurde eine Korrelations-Software für die hochaufgelösten Aufnahmen der Proben mit den Speckle-Mustern entwickelt. Die hierfür entwickelten Algorithmen für die Auswertung und die Analyse-Protokolle sind auch auf andere Nanomaterialien und Partikeltypen übertragbar.

Mit der im Projekt entwickelten spektroskopischen 3D-Bildgebung konnten Nanopartikel hinsichtlich Größe, Morphologie und optischen Eigenschaften auf neuartige Weise charakterisiert werden. So konnte auch das Partikelverhalten in biologischen Umgebungen dreidimensional und mit hoher Sensitivität erfasst werden, sodass sich Rückschlüsse auf deren Stabilität, Aggregationsverhalten und Interaktion mit Zellen ziehen lassen. Weiterhin konnten erste Lebendzell-Messungen an intrazellulären Vesikeln durchgeführt werden.



molecule density, a.u.

Durch den Einsatz von Eventkameras gewonnene Aufnahmen aus fluoreszent markierten Mikrotubuli Proben, die in einem Einzelmolekül-Lokalisierungsmikroskopie-artigen Modus erstellt wurden.

Die Verwertung

Die erarbeiteten Verfahren zur simultanen Erfassung von Streu- und Fluoreszenzsignalen eröffnen neue Möglichkeiten, Nanopartikel in komplexen biologischen Proben eindeutig zu detektieren und zu quantifizieren.

KMU-Nutzen

Das im Projekt entwickelte Mikroskopiemodul entspricht einer skalierbaren Technologie, die bestehende Mikroskopieplattformen ohne kostenintensive Neuanschaffungen erweitern kann.

Die Projektergebnisse können in verschiedenen Bereichen, wie der Biomedizin, in der Neuroforschung für schnellste, hochauflösende Analysen subzellulärer Strukturen, in der Zellbiologie für Echtzeit-Monitoring von Organellen sowie in der Pathologie für eine verbesserte Diagnostik, verwendet werden. Hierfür können Unternehmen der mittelständisch geprägten Medizintechnik-Branche entsprechende Tools auf Basis der Projektergebnisse vermarkten. Die Projektergebnisse können jedoch auch für die Inspektion von Mikrochips und Wafern in der Halbleiterbranche, für hochauflösende Endoskopie- und Diagnosesysteme und die Analyse nanoskaliger Strukturen in der Materialwissenschaft genutzt werden.

Umsetzung

Ein Unternehmen des projektbegleitenden Ausschusses (PA) nutzte das entwickelte System für die Prüfung eines neuen 3D-Testtargets mit fluoreszierenden Punkten in definierter Tiefe. Nach Projektende wurde zusammen mit PA-Unternehmen aus den Bereichen Mikroskopie, Biotechnologie und Halbleiterindustrie an der Optimierung der Beleuchtungstechnologie weiter geforscht. Eine Weiterentwicklung der Technologie für weitere spezifische industrielle Anwendungen ist geplant.